

# MAC-ELISA para Zika

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

**Para usar conforme a una autorización de uso de emergencia solamente**

Indicaciones para el uso

# Índice

<i>Introducción</i> .....	3
<i>Propósito</i> .....	3
<i>Especímenes</i> .....	4
<i>Formulaciones</i> .....	4
<i>Control de calidad</i> .....	4
<i>Algoritmo de pruebas</i> .....	4
<i>Ensayo de Z Zika</i> .....	4
<i>Interpretación de los resultados de la prueba</i> .....	4
<i>Limitaciones del ensayo</i> .....	4
<i>Características de desempeño</i> .....	4
<i>Contacto</i> .....	4
<i>Referencias</i> .....	4

## Introducción

### PROPÓSITO

Este documento describe el uso de un ensayo de captura de anticuerpo IgM y la detección mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (MAC-ELISA) para la detección presunta de anticuerpos contra el virus del Zika en personas que cumplen con los requisitos clínicos o epidemiológicos de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) para las pruebas del virus del Zika.

Esta prueba solo debe utilizarse según se describe en las directrices de los CDC para hacer pruebas de diagnóstico del virus del Zika y conforme a la autorización de uso de emergencia (EUA, por sus siglas en inglés) de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés). Visite el sitio web de los CDC para ver las directrices vigentes para laboratorios: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>

### USO PREVISTO

El CDC MAC-ELISA para Zika ha sido desarrollado para utilizarse en la detección cualitativa de anticuerpos IgM contra el virus del Zika en suero o líquido cefalorraquídeo (LCR) de seres humanos. El LCR se debe enviar junto con un espécimen de suero del paciente, estos especímenes deben ser tomados de personas que cumplen con los requisitos clínicos de los CDC para el virus del Zika (p. ej., antecedentes de signos y síntomas clínicos asociados a una infección por el virus del Zika) o los requisitos epidemiológicos de los CDC relacionados con el virus del Zika (p. ej., historial reciente de viajes a regiones geográficas durante un período de transmisión activa del virus del Zika u otros requisitos epidemiológicos que pueden indicarse para las pruebas del virus del Zika como parte de una respuesta de salud pública. El ensayo está destinado a ser utilizado en laboratorios calificados designados por los CDC, como parte de un algoritmo de múltiples pruebas.

Los resultados del ensayo son para la posible identificación de anticuerpos IgM contra el virus del Zika. Los resultados positivos y equívocos no son definitivos para diagnosticar una infección por el virus del Zika. Los resultados falsos positivos son posibles en pacientes con un historial previo de infección por otros flavivirus. La confirmación de los resultados que indican la existencia de anticuerpos IgM contra al virus del Zika en especímenes equívocos o presuntos positivos requiere pruebas adicionales realizadas por los CDC o por laboratorios calificados, designados por los CDC, previa consulta con los CDC, utilizando el algoritmo proporcionado por esta entidad. Los laboratorios tienen la obligación de reportar los resultados positivos a las autoridades de salud pública que correspondan. En los Estados Unidos y sus territorios, los laboratorios calificados, designados por los CDC, deben reportar a los CDC los resultados equívocos y presuntos positivos

Los resultados de esta prueba no pueden utilizarse como la única fuente en la que basar las decisiones relacionadas con el manejo de los pacientes, y además deben combinarse con las observaciones clínicas, el historial clínico del paciente, la información epidemiológica y otras pruebas de laboratorio. Los niveles de IgM para el Zika durante el curso de la enfermedad no están bien caracterizados. Los niveles de IgM son variables aunque normalmente arrojan un resultado positivo a partir del día cuatro aproximadamente después de la aparición de los síntomas y durante 12 semanas o más después de la infección inicial.

Los resultados negativos no descartan la posibilidad de que haya infección por el virus del Zika, ya sea pasada o actual. Los resultados negativos pueden obtenerse en especímenes recogidos antes del día cuatro después de la aparición de los síntomas o después del cierre de la ventana de IgM detectable.

MAC-ELISA para Zika está orientado a ser utilizado por el personal de laboratorio capacitado, que sea competente en la realización e interpretación de inmunoensayos en laboratorios calificados, designados por los CDC. MAC-ELISA para Zika solo debe utilizarse conforme a la EUA de la FDA.

## LIMITACIONES AL USO DEL PROTOCOLO

El ensayo MAC-ELISA que aquí se describe no ha sido probado extensamente con especímenes clínicos. No se permiten modificaciones de estos ensayos (es decir, el uso de plataformas o químicas diferentes de las que se describen). Estos ensayos no deben publicarse sin el consentimiento explícito de los CDC.

## PRINCIPIO DEL ENSAYO

Los ensayos que detectan la inmunoglobulina M (IgM) específica del virus ofrecen grandes ventajas porque detectan los anticuerpos que se generan durante los primeros días después de la aparición de los síntomas clínicos en una infección inicial, obviando la necesidad de especímenes en la fase de convalecencia en muchos casos. La captura de IgM es el mejor enfoque en la detección de IgM porque es sencillo, sensible y aplicable a muestras de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) de una variedad de especies animales (p. ej., especies humana, equina, aviar).

El ensayo de captura de anticuerpo IgM y la detección mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (MAC-ELISA) representa una alternativa útil a la inmunofluorescencia para la documentación de una respuesta serológica. ELISA es menos subjetivo que la inmunofluorescencia, y se pueden procesar un gran número de muestras. Los anticuerpos IgM (los anticuerpos de captura) están recubriendo las placas de 96 pocillos. A continuación y de manera secuencial, se agrega el suero del paciente y luego el antígeno viral no infeccioso conocido. La presencia del antígeno se detecta mediante el uso de un anticuerpo antiviral conjugado a una enzima. Un resultado colorimétrico es generado por la interacción de la enzima y un sustrato cromogénico. Este cambio cromogénico se detecta mediante un espectrofotómetro (lector de ELISA).

## Especímenes

### ESPECÍMENES ACEPTABLES

- Suero de seres humanos en fase aguda y convaleciente  
NOTA: El suero debería recolectarse en un tubo con separador para suero. El tubo se debe centrifugar y el suero se debe decantar antes del envío para evitar hemólisis.
- Especímenes de líquido cefalorraquídeo (LCR)  
El LCR solo puede someterse a pruebas cuando se envía junto con el espécimen de suero del paciente.

### MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE ESPECÍMENES

Almacene todos los especímenes de diagnóstico a 2-8° C antes de hacerles las pruebas y a  $\leq -20^{\circ}$  C después de haber completado todas las pruebas anticipadas. Evite congelar y descongelar reiteradas veces. **Las muestras de los pacientes inactivarse durante 30 minutos en baño maría a una temperatura de 56° C. Si existe la posibilidad de que la muestra contenga el virus del Chikungunya, la inactivación debería prolongarse a 2 horas.** **SEGURIDAD/PRECAUCIONES**

Se recomienda a los laboratorios realizar una evaluación de riesgos al hacer nuevas pruebas; y las precauciones de seguridad deberían basarse en la evaluación de riesgos del laboratorio. Si hay posibilidad de que se trate de infección por el virus del Chikungunya, los trabajadores del laboratorio deberían reconocer que este virus produce altos niveles de viremia y el suero de casos sospechosos del virus de Chikungunya debería tratarse como potencialmente infeccioso incluso para los procedimientos serológicos. Consulte las directrices de los CDC para

laboratorios de salud pública estatales y locales: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>. Consulte la publicación Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) («Bioseguridad en los laboratorios microbiológicos y biomédicos») para obtener más información sobre bioseguridad relacionada con estos virus y las prácticas de bioseguridad del laboratorio.

Este procedimiento debería completarse bajo condiciones de seguridad específicas para laboratorios que consideran la posible naturaleza infecciosa de los especímenes de suero involucrados. Después de la inactivación por calor, se recomienda como mínimo que estos procedimientos se lleven a cabo en centros BSL-2 y aplicando las prácticas BSL-3. A fin de garantizar la seguridad del personal del laboratorio, manipule todos los especímenes dentro de un gabinete de seguridad biológica (BSC) Clase II (o superior).

**AVISO LEGAL:** Los nombres de los proveedores o fabricantes se proporcionan como ejemplos de fuentes de productos adecuadas. El uso de nombres comerciales es con fines de identificación solamente y no implica la aprobación por parte de los CDC ni del Departamento de Salud y Servicios Humanos.

### **MATERIALES PROVISTOS POR LOS CDC**

NOTA: Estos materiales serán provistos por los CDC, Ft. Collins, CO. Para solicitar estos reactivos, envíe un correo electrónico a la Dra. Barbara Johnson a [bfj9@cdc.gov](mailto:bfj9@cdc.gov)

- **Antígeno Normal Vero E6 (catálogo de los CDC #AV0001);** antígeno normal liofilizado
- **Antígeno en cultivo celular Zika Vero E6 (catálogo de los CDC #AV0002 o AV0003;** estos son antígenos producidos a partir de diferentes cepas del virus del Zika; el ensayo requiere solo uno); antígeno liofilizado para el virus del Zika (inactivado) preparado para usar en el ELISA por IgM para el Zika.
- **Control positivo de IgM contra el flavivirus (catálogo de los CDC #AV0004):** Anticuerpo monoclonal quimérico, específico para flavivirus; liofilizado.

**Los controles positivos y negativos del ensayo deberían realizarse al mismo tiempo que todas las muestras de la prueba.**

### **MATERIALES OBLIGATORIOS PERO QUE NO SE PROVEEN**

NOTA: Para los materiales que deben diluirse/ajustarse, ver **Formulaciones** a continuación.

- Detección de anticuerpos conjugados: Anticuerpo monoclonal 6B6C-1 conjugado a peroxidasa de rábano picante Disponible en:
  - Hennessy Research, catálogo #DC153-100 o
  - InBios (cualquier artículo es aceptable),
    - Artículo 500510: 6B6C-1/HRP conjugado (sin diluir), 50 uL
    - Artículo 500510D: 6B6C-1/HRP conjugado (1/100 diluido a partir de la existencia), 1mL
- Anticuerpo de cabra anti-IgM humano (Kirkegaard and Perry Laboratories, catálogo #01-10-03)
- Agua desionizada
- Ácido clorhídrico (para ajustar el pH del amortiguador de carbonatos)
- Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>); (disponible en múltiples fuentes comerciales, p. ej. Sigma, Thermo Fisher, etc.)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>); (disponible en múltiples fuentes comerciales, p. ej. Sigma, Thermo Fisher, etc.)
- Amortiguador de fosfato salino (PBS); (disponible en múltiples fuentes comerciales, p. ej. Sigma, Thermo Fisher, etc.)
- Tween 20 (disponible en múltiples fuentes comerciales, p. ej. Sigma, Thermo Fisher, etc.)

- Leche en polvo descremada (disponible a partir de múltiples fuentes comerciales, p. ej. Sigma, Thermo Fisher, etc.)
- Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); (disponible en múltiples fuentes comerciales, p. ej. Sigma, Thermo Fisher, etc.)
- Placas de 96 pocillos con fondo plano Immulon II HB, Dynatech Technologies, catálogo #3455 (disponible a partir de múltiples fuentes comerciales, p. ej. Sigma, Thermo Fisher, etc.)  
NOTA: Esta es la única placa de 96 pocillos aprobada para este ensayo.
- Sustrato mejorado K-Blue TMB (base de tetrametilbencidina 3,3', 5, 5'; Neogen Corp, catálogo #308175)
- Suero humano normal; con resultado negativo para anticuerpos contra el virus del Zika

## EQUIPOS E INSUMOS

- Lavador de microplacas
- Lector de microplaca con filtro de 450 nm
- Gabinete de bioseguridad (BSC)
- Incubadora configurada a 37° C
- Pipetas simples y multicanales (canal simple de 100 µL o 200 µL, 12 canales de 100 µL o 200 µL)
- Puntas de pipetas para las pipetas del listado
- Reservorios de reactivos
- cronómetro
- Botellas para reactivos; botellas de vidrio estériles de 1L; Gibco u otro proveedor
- Tubos de microcentrífuga para diluir el suero del paciente; comprar estéril o para autoclave y dejar enfriar antes de usar; Corning u otro proveedor
- Bandejas para pesar componentes químicos secos, resistentes a productos químicos

## Formulaciones

Marcador permanente

**NOTA: Las diluciones proporcionadas representan el punto de partida para la titulación . Los laboratorios deben determinar la dilución óptima para su laboratorio en particular. Ver más información en Estandarización del ensayo en la página 13.**

- Amortiguador de sensibilización: amortiguador de carbonato/bicarbonato, pH 9.6  
1.59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 2.93 g NaHCO<sub>3</sub> diluido en 1 litro de agua.
- Amortiguador de lavado: amortiguador fosfato salino (PBS); 0.05% Tween 20, pH 7.2.  
El PBS está disponible en polvo en varias fuentes comerciales
- Amortiguador de bloqueo: PBS/ 5% de leche/ 0.5% Tween 20
- Solución de parada: 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Anticuerpo de detección conjugado : El conjugado puede diluirse hasta 1:5000 en el amortiguador de bloqueo
- Control positivo de IgM contra el flavivirus: Control positivo de IgM contra el flavivirus diluido hasta 1:3000 en el amortiguador de lavado
- Antígeno Zika Vero E6: diluido hasta 1:160 en el amortiguador de lavado
- Antígeno Normal Vero E6: diluido hasta 1:160 en el amortiguador de lavado
- Anticuerpo de cabra anti-IgM humano: diluido a 1:2000 en el amortiguador de sensibilización ( requiere titulación )
- Suero del paciente: diluido a 1:400 en el amortiguador de lavado (no requiere titulación)

- Control negativo: Suero humano normal diluido a 1:400 (no requiere titulación)
  - Los nuevos lotes de suero humano normal deben ser probados siguiendo este protocolo como si fueran muestras experimentales. Si la DO en el antígeno viral NO es 2 veces mayor que la DO en el antígeno normal, se puede presumir que es negativo.

## Control de calidad

### CONSIDERACIONES GENERALES

- El personal debe estar familiarizado con el protocolo y los instrumentos que se utilizan.
- Use batas desechables limpias, que no hayan sido usadas previamente, y guantes nuevos sin polvo durante la manipulación y el ajuste del reactivo del ensayo. Cámbiese los guantes cada vez que sospeche que pueden estar contaminados.
- Almacene todos los reactivos a las temperaturas adecuadas (ver las hojas informativas de los productos). No use los reactivos que estén vencidos.
- Mantenga los tubos de los reactivos tapados lo más que pueda.
- Use puntas de pipetas con barrera para aerosoles (filtros) solamente.
- Deseche toda la basura todos los días.

### CONTROLES DEL ENSAYO

Los controles del ensayo deben probarse al mismo tiempo que todas las muestras de prueba.

Controles de anticuerpos:

- Control positivo: Control positivo de IgM contra flavivirus
- Control negativo: suero humano normal.

Determinación de reactividad no específica :

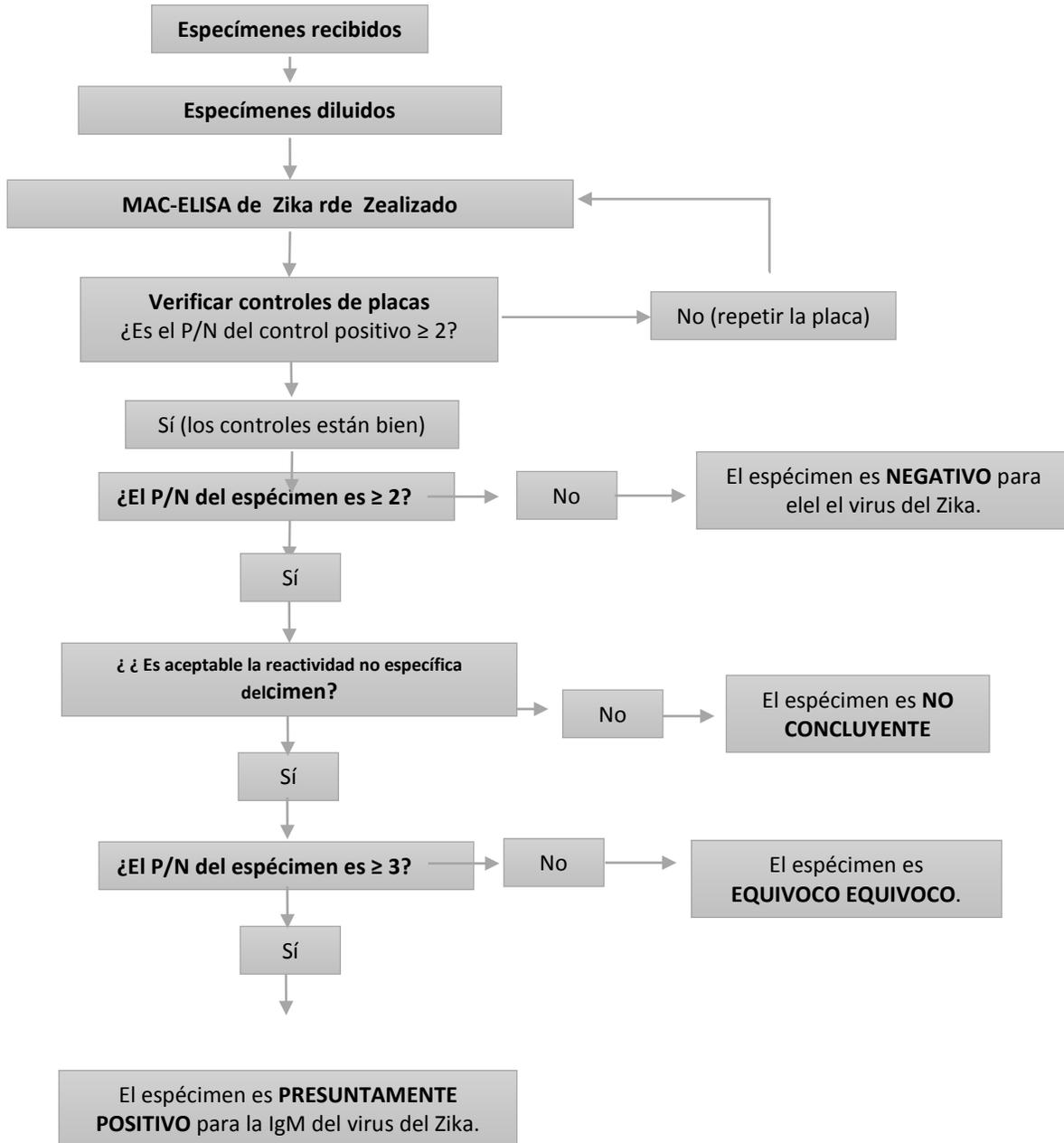
- El espécimen reaccionó con el antígeno Normal Vero E6 (para medir la señal de reactividad no específica generada por el espécimen).

**Tabla 1: Visión general de los controles positivos y negativos**

<b>Cálculo</b>	<b>Cociente</b>	<b>Resultado</b>
P/N del control positivo	DO media del suero del control positivo <u>en el</u> <u>antígeno Zika Vero E6 (P)</u> DO media del suero del control negativo en el antígeno <u>Zika Vero E6 (N)</u>	$< 2$ La placa NO ES válida
		$\geq 2$ La placa ES válida
Reactividad No Específica del espécimen P/N (para especímenes con $P/N \geq 2$ Ver Figura 1)	DO media del espécimen en el antígeno <u>Zika Vero E6 (P)</u> DO media del espécimen en el antígeno Normal Vero E6	$< 2$ El espécimen es no concluyente
		$\geq 2$ El espécimen puede interpretarse según el algoritmo de pruebas

## Algoritmo de pruebas

Figura 1: Resumen de la interpretación de los resultados de la prueba



Siga los requisitos de medidas e informes específicos descritos en la Tabla 2.

## Ensayo de Z Zika

### NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO ELISA:

- Las placas sensibilizadas con anticuerpo de captura pueden almacenarse a 2-8° C por hasta una semana. (Ver Paso 2: Sensibilización de las placas, a continuación).
- Los sueros de control sin diluir pueden almacenarse a 2-8° C por hasta 2 semanas.
- Los antígenos virales y Normal Vero E6 reconstituidos sin diluir pueden almacenarse a  $\leq -20^{\circ}$  C por tiempo indefinido.
- Los sueros de control y de prueba pueden diluirse a las diluciones de trabajo y refrigerarse un día antes de ser usados.
- Los antígenos y el conjugado *deben diluirse a las diluciones de trabajo inmediatamente antes de usar.*

**NOTA:** EL SIGUIENTE PROCEDIMIENTO INCLUYE INFORMACIÓN SOBRE EL CONTROL DE CALIDAD Y LA INTERPRETACIÓN. CADA ESPÉCIMEN DE SUERO ES SOMETIDO A PRUEBAS EN TRIPLICADO EN LOS ANTÍGENOS VIRALES Y NORMAL VERO E6. SE PUEDEN ANALIZAR OCHO (8) ESPECÍMENES POR PLACA. DEBIDO AL VOLUMEN LIMITADO, LOS ESPECÍMENES DE LCR POR LO GENERAL SE ANALIZAN EN SENCILLO SOLAMENTE.

#### 1. PREPARACIÓN DE LA PLACA:

Determine el número de placas ELISA que se necesitan. Con un marcador permanente de punta fina, enumere y rotule las placas de 96 pocillos. Identifique la ubicación de cada espécimen clínico (S1-S8) usando una plantilla correspondiente (ver Figura 2). *Para mantener la consistencia al añadir los reactivos procese las placas en el mismo orden que fueron numeradas durante todos los pasos del procedimiento.* Las placas deberían conservarse en un entorno cerrado y húmedo durante todos los tiempos de incubación, salvo en el paso de sensibilización. Para este fin se puede utilizar una bolsa grande del tipo Ziploc que contenga una toalla de papel humedecida.

#### 2. SENSIBILIZACIÓN DE LAS PLACAS:

- Diluya el anticuerpo de cabra anti-IgM humana 1:2000 en el amortiguador de sensibilización, pH 9.6.
- Cubra los 60 pocillos internos de la placa de 96 pocillos con 75  $\mu$ L por pocillo del anticuerpo de cabra anti-IgM humana diluido. Deje vacías las filas/columnas externas (ver Fig. 2).
- Incube a **2-8° C por la noche**. Las placas deben permanecer a 2-8° C hasta que se necesiten para hacer las pruebas, por un máximo de una semana.

#### 3. BLOQUEO DE LAS PLACAS:

- Después de la incubación nocturna, sacuda las placas para remover el anticuerpo de captura.
- Seque las placas sobre papel toalla u otro material absorbente.
- Bloquee las placas con 200  $\mu$ L por pocillo del amortiguador de bloqueo.
- Incube a **temperatura ambiente durante 30 minutos**.

#### 4. LAVADO DE LAS PLACAS:

- Lave los pocillos 5 veces con el amortiguador de lavado usando un lavador de placas automático.
- Los pocillos deben llenarse completamente en cada ciclo (es decir, 300  $\mu$ L).

#### 5. INCORPORACIÓN DE MUESTRAS/CONTROLES:

- Diluya el suero del paciente a 1:400 en el amortiguador de lavado.
- Agregue 50  $\mu$ L por pocillo del suero del paciente diluido (S) a un bloque de 6 pocillos o LCR sin

diluir a dos pocillos solamente. El LCR será probado en sencillo contra los antígenos virales y Normal Vero E6.

NOTA: El LCR se puede diluir hasta un máximo de 1:5 en amortiguador de lavado si es necesario para obtener volumen suficiente para la prueba.

- Agregue 50 µL de control positivo de IgM de flavivirus (Ref) diluido en un amortiguador de lavado según determinado en una titulación previa.
- Diluya el control de suero humano negativo (N) 1:400 en un amortiguador de lavado.
- Agregue 50 µL de control de suero humano negativo (N) diluido (1:400 en amortiguador de lavado) a un bloque de 6 pocillos.
- Incube las placas por **1 hora a 37° C** en una cámara humidificada.

#### 6. LAVADO DE LAS PLACAS:

- Lave los pocillos 5 veces con un amortiguador de lavado usando un lavador de placas automático.
- Los pocillos deberían llenar hasta arriba en cada ciclo.

#### 7. INCORPORACIÓN DE ANTÍGENO:

- Diluya antígeno **Zika** Vero E6 en un amortiguador de lavado según determinado en una titulación previa. Diluya antígeno **Normal** Vero E6 en un amortiguador de lavado a la misma concentración que la del antígeno **Zika** Vero E6.
- Agregue 50 µL por pocillo de antígeno **Zika** Vero E6 diluido a los tres pocillos de la izquierda de cada bloque de suero (ver Fig. 2).
- Agregue 50 µL por pocillo de antígeno **Normal** Vero E6 diluido a los tres pocillos de la derecha de cada bloque (ver Fig. 2).
- Incube las placas **toda la noche a 2-8° C** en una cámara humidificada.

#### 8. LAVADO DE LAS PLACAS:

- Lave los pocillos 5 veces con un amortiguador de lavado usando un lavador de placas automático.
- Los pocillos deberían llenar hasta arriba en cada ciclo.

#### 9. INCORPORACIÓN DE CONJUGADO:

- Diluya anticuerpo monoclonal conjugado a peroxidasa de rábano picante en la amortiguadora de bloqueo según determinado en una titulación previa.
- Agregue 50 µL por pocillo de anticuerpo monoclonal conjugado a peroxidasa de rábano picante diluido.
- Incube las placas por **1 hora a 37° C** en una cámara humidificada.

10. Encienda el lector de placas para que se caliente.

11. Saque el TMB-ELISA del refrigerador.

#### 12. LAVADO DE LAS PLACAS:

- Lave los pocillos 5 veces en duplicado con amortiguador de lavado con un lavador de placas automático.
- Gire las placas 180° en el lavador luego de la primera serie de 5 ciclos y lave 5 veces mas Esto brinda resultados consistentes.
- Los pocillos deben llenar hasta arriba en cada ciclo.

#### 13. INCORPORACIÓN DEL SUSTRATO:

- Con la placa a temperatura ambiente (20-25° C), agregue 75 µL por pocillo de sustrato de TMB a todos los pocillos.
- Cubra las placas inmediatamente para que no entre luz. Deje incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Aparecerá un color azul en los pocillos que den positivo en anticuerpos.

#### 14. INCORPORACIÓN DE SOLUCIÓN DE PARADA:

- Agregue 50 µL por pocillo de la solución de parada a todos los pocillos, incluidas las filas externas de los pocillos de la placa.
- NOTA: El lector de placas usar de blanco algunos de los pocillos externos.
- Los pocillos que estaban en azul ahora cambiarán a color amarillo.
- Deje reposar las placas a temperatura ambiente por 1 minuto.
- Lea las placas en un lector de placas de microtitulación con un filtro de 450 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO
B	VACÍO	Antígeno viral	Antígeno normal	VACÍO								
C	VACÍO	Antígeno viral	Antígeno normal	VACÍO								
D	VACÍO	Antígeno viral	Antígeno normal	VACÍO								
E	VACÍO	Antígeno viral	Antígeno normal	VACÍO								
F	VACÍO	Antígeno viral	Antígeno normal	VACÍO								
G	VACÍO	Antígeno viral	Antígeno normal	VACÍO								
H	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO	VACÍO

Figura 2: Formato de la placa de 8 muestras y controles

#### ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO

El MAC-ELISA debe estar estandarizado y validado antes de su uso en el laboratorio y la reestandarización se debe hacer periódicamente. Esto debe ocurrir cuando se introducen nuevos números de lote y, como mínimo, una vez al año. Se recomienda que el promedio de la densidad óptica del suero de control positivo reaccionado con el antígeno Zika Vero E6 se establezca en 1.0 aproximadamente. El suero de control normal reaccionado con el antígeno Zika Vero E6 debe ser 0.2 (esto varía). La estandarización de reactivos se consigue normalmente a través de titulación, siempre comparando las densidades ópticas de los reactivos cuando reaccionan con el antígeno viral y Normal Vero E6. La estandarización y la reestandarización se pueden confirmar con paneles de verificación de pruebas.

## Interpretación de los resultados de la prueba

### DETERMINACIÓN DE LA VALIDEZ DE LA PRUEBA

Antes de poder calcular los resultados de cada espécimen clínico, la prueba debe determinarse como **válida**. Para que una prueba sea válida, la siguiente proporción debe ser igual o mayor a 2.0. **Este es el P/N del control positivo.**

$$\frac{\text{DO media del control positivo IgM de flavivirus reaccionado con el antígeno Zika Vero E6 (P)}}{\text{DO media del suero humano normal reaccionado con el antígeno Zika Vero E6 (N)}}$$

Se debe determinar la validez de la prueba para cada placa. Solo se pueden determinar los resultados de los especímenes clínicos si la prueba es válida. Si la prueba no es válida, se debe repetir la placa. Si el P/N del control positivo sigue fallando después de una repetición, es probable que uno o más reactivos o parámetros de la prueba tengan un error y, por tanto, se deberá solucionar.

### DETERMINACIÓN DEL P/N DEL ESPÉCIMEN

Para determinar si los especímenes clínicos (S1-S8) contienen IgM del virus del Zika (lo que indicaría infecciones recientes de dicho virus) se debe calcular lo siguiente:

$$\frac{\text{DO media del espécimen de prueba reaccionada con el antígeno Zika Vero E6 (P)}}{\text{DO media del suero humano normal reaccionado con el antígeno Zika Vero E6 (N)}}$$

**Este es el P/N del espécimen de la prueba.**

Todas las pruebas cuyo P/N del espécimen es  $<2$ , se reportan como **negativas**. No se requieren más análisis. Ver Tabla 2 a continuación.

### EVALUACIÓN DE LA REACTIVIDAD NO ESPECÍFICA DEL ESPÉCIMEN

Para cada espécimen con un P/N de espécimen  $\geq 2$ , se debe determinar si se han generado reactividad noespecífica. .

El valor de P (DO media del espécimen de prueba reaccionada con el antígeno Zika Vero E6) del espécimen de prueba debe ser igual o mayor a dos (2) veces la DO media del espécimen de prueba reaccionada con el antígeno Normal Vero E6. Si no se cumple este requisito, se generará reactividad no específica, y el resultado **SE DEBE** reportar como **inconcluso**. Los especímenes inconclusos se deben volver a someter a pruebas. Si una nueva prueba ofrece también resultados inconclusos, envíe el espécimen para un análisis más amplio y/o solicite la recogida de suero adicional para su análisis. Si se cumplen los requisitos, proceda a interpretar los resultados del espécimen.

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS POSITIVOS Y EQUÍVOCOS

Todos los valores P/N del espécimen de prueba iguales o mayores a 3.0 se deben reportar como supuestos positivos de IgM (ver tabla a continuación), siempre que reúnan los requisitos que aparecen arriba. En el caso de que un LCR agudo en una etapa temprana o un suero sea negativo en esta prueba, se debe solicitar un espécimen de suero convaleciente y someterlo a pruebas antes de que el paciente sea reportado como negativo de evidencia serológica de una infección viral reciente. Si no se somete a pruebas un espécimen convaleciente, un resultado

negativo puede reflejar la prueba de un espécimen en fase aguda obtenida antes de que los anticuerpos hayan aumentado a niveles detectables.

Los valores P/N comprendidos entre 2.0 y 3.0 se deben considerar **equivocos**. Se deberán realizar más pruebas para determinar el estado de estos especímenes (ver Tabla 2 a continuación).

Se debe destacar que el valor P/N de un espécimen en la dilución de 1:400 en la evaluación no es indicación de concentración de anticuerpos absoluta, es decir, el valor P/N no es cuantitativo.

**Tabla 2: Interpretación de resultados del MAC-ELISA para Zika**

<b>P/N del espécimen de la prueba</b>	<b>Interpretación</b>	<b>Informe</b>	<b>Acción</b>
<b>&lt; 2</b>	Negativo	Ninguna evidencia reciente detectada de infección por el virus del Zika.	Reportar los resultados. Si se trata de un espécimen en fase aguda temprana, consultar las instrucciones de interpretación más arriba.
<b><math>2 \leq P/N &lt; 3</math></b>	Equívoco	Los resultados del MAC-ELISA para Zika fueron equívocos por la presencia de anticuerpos contra el virus del Zika.	Enviar informe a los CDC junto con el espécimen para las pruebas de confirmación.
<b><math>\geq 3</math></b>	Presunto positivo	Evidencia serológica de posible infección reciente por el virus del Zika identificada. Se requieren pruebas adicionales.	Enviar informe a los CDC junto con el espécimen para las pruebas de confirmación.

**Todos los resultados positivos se deben reportar a los CDC a través de ArboNET.**

Para obtener información sobre el algoritmo de pruebas del Zika, consulte las directrices de los CDC para laboratorios de salud pública locales y estatales: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>

Para ver las instrucciones para remitir especímenes, visite:

<http://www.cdc.gov/zika/hc-providers/diagnostic.html>

## Limitaciones del ensayo

La interpretación de los resultados del MAC-ELISA para Zika debe tener en cuenta la posibilidad de resultados falsos negativos y falsos positivos. Los resultados falsos negativos pueden surgir de:

- La toma de la muestra se realizó antes de que los IgM alcanzaran niveles detectables (normalmente unos 4 días después de la aparición de síntomas).
- La toma de muestra se realizó después de que los IgM descendieran por debajo de los niveles detectables (normalmente unas 12 semanas después de la aparición de síntomas).
- No haber seguido los procedimientos de ensayo autorizados.

La causa más habitual de resultados falsos positivos es la reactividad cruzada con IgM específica de otros flavivirus como el virus del dengue. Solo se han realizado evaluaciones limitadas de reactividad cruzada con flavivirus o arbovirus. No se ha evaluado la reactividad cruzada con el factor reumatoide. Los datos clínicos indican la posibilidad de reactividad cruzada con anticuerpos contra el virus del dengue. Es necesario realizar pruebas de seguimiento para descartar resultados falsos positivos. La confirmación de la presencia de IgM contra el Zika requiere pruebas de los CDC o de un laboratorio designado por los CDC. El método estándar de referencia para la confirmación de la presencia de anticuerpos contra el Zika es la Prueba de Neutralización por Reducción de Placas (PRNT, por sus siglas en inglés).

Todas las pruebas del Zika deben realizarse siguiendo las directrices del laboratorio emitidas por los CDC y sus algoritmos de pruebas: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>.

Los resultados negativos no descartan la infección por el virus del Zika y no deben utilizarse como base única para la decisión de tratar/ manejar a un paciente. Todos los resultados los debe interpretar un profesional entrenado junto con la revisión del historial y los signos y síntomas del paciente.

Este ensayo es para el uso diagnóstico *in vitro* bajo la Autorización de Uso de Emergencia de la FDA únicamente, y está limitado a laboratorios calificados designados por los CDC.

Todos los especímenes deben ser manipulados como si fueran infecciosos. Se deben emplear las precauciones de bioseguridad apropiadas, incluyendo un equipo de protección personal, cuando se manipulen todos los especímenes.

Una toma de muestra correcta, el almacenamiento y el transporte apropiados de los especímenes, son fundamentales para unos resultados correctos.

El desempeño solo se ha establecido con los tipos de especímenes que se enumeran en la sección del Uso Previsto. No se aceptan otros tipos de especímenes para su uso en este ensayo.

## Características de desempeño

### Reactividad cruzada

#### Reactividad cruzada del flavivirus

Se seleccionaron sueros conocidos del banco de sueros de los CDC para evaluar la reactividad cruzada del MAC-ELISA para Zika. No se observó reactividad cruzada entre el MAC-ELISA para Zika y otros flavivirus que no fueran dengue.

**Tabla 3: Resumen de reactividad cruzada del flavivirus**

Flavivirus	Descripción del espécimen	Especímenes analizados	Negativo del MAC-ELISA para Zika
VNO	Sueros de casos confirmados del Virus del Nilo Occidental.	4	4 (100%)
ESL	Sueros de casos confirmados de encefalitis St. Louis	1	1 (100%)
VFA	Sueros de personas vacunadas contra el virus de la fiebre amarilla	4	4 (100%)
VEJ	Sueros de personas vacunadas contra el virus de la encefalitis japonesa	2*	2 (100%)

\*Dos sueros dentro del recipiente de vacunas contra la FA procedían de personas que también se vacunaron contra la EJ, por tanto, este es un subconjunto de los especímenes de la fila anterior.

El virus del dengue no estaba incluido dentro de la evaluación de reactividad cruzada. Los datos de pruebas clínicas que se muestran a continuación demuestran una importante reactividad cruzada del MAC-ELISA para Zika a los anticuerpos IgM contra el virus del dengue.

#### Reactividad cruzada de no flavivirus

No se ha llevado a cabo ningún estudio experimental con el MAC-ELISA para Zika para determinar la reactividad cruzada del IgM contra los no-flavivirus. Sin embargo, la literatura (Martin, et al., 2000) indica que solo se espera una reactividad cruzada mínima con IgM contra los alfavirus y los bunyavirus.

Los arbovirus se describieron en un principio en tres grupos a base de importantes diferencias serológicas caracterizadas con técnicas serológicas tempranas y crudas. Estas descripciones se mantienen: Los virus del grupo A son ahora alfavirus, los del grupo B son flavivirus y los del grupo C, bunyavirus. A medida que los métodos serológicos han evolucionado, las distinciones serológicas que originariamente definieron los grupos exponen que no se espera una reactividad cruzada entre grupos en inmunoensayos.

### Desempeño clínico

#### Desempeño con especímenes de los EE. UU. enviados a los CDC, Ft. Collins, de 2015 al presente

En el período de enero de 2015 al 13 de febrero de 2016, los CDC realizaron sus pruebas para el Zika, MAC-ELISA y PRNT, a 167 sueros y 2 especímenes de LCR.

### Resumen del desempeño clínico con los sueros

De los 167 registros de pruebas de sueros, un subgrupo era de especímenes pareados de sangrados en serie. De éstos, solo se incluyeron las primeras muestras de sangre positivas o equívocas para IgM. Si ambas muestras de sangre en serie eran negativas, solo se incluía la primera. El conjunto de datos resultantes utilizado en este análisis es de 161 sueros. En la Tabla 5 se muestra un resumen de resultados de estos sueros. Cuarenta y cuatro de estos registros de pruebas indicaron que procedían de mujeres embarazadas. En la Tabla 6 se muestra un resumen de datos del subgrupo de sueros procedentes de mujeres embarazadas.

**Tabla 5: Datos de los sueros enviados a los CDC Ft. Collins para pruebas de 2015 a la actualidad**

		Resultados de la PRNT			
		Zika	flavivirus	dengue	negativo
MAC-ELISA para Zika	positivo	45	16	23	9
	equívocos	1	0	9	13
	negativo	0	0	6	39

Porcentaje de concordancia positiva (solo positivos de Zika definitivos en la PRNT):  $45/46 = 97.8\%$  (95% IC: 88.7% - 99.6%)

Porcentaje de concordancia negativa:  $45/99 = 45.5\%$  (95% IC: 36.0% - 55.3%)

**Tabla 6: Datos de los sueros de mujeres embarazadas enviados a los CDC Ft. Collins para pruebas de 2015 a la actualidad**

		Resultados de la PRNT			
		Zika	flavivirus	dengue	negativo
MAC-ELISA para Zika	positivo	3	2	1	3
	equívocos	0	0	2	8
	negativo	0	0	1	24

Porcentaje de concordancia positiva (solo positivos de Zika definitivos en la PRNT):  $3/3 = 100\%$  (95% IC: 43.9% - 100%)

Porcentaje de concordancia negativa:  $25/39 = 64.1\%$  (95% IC: 48.4% - 77.3%)

### Resumen de datos de LCR

Ambos especímenes de LCR sometidos a pruebas de los CDC ofrecieron resultados positivos de infección por el virus del Zika, tanto en el MAC-ELISA para Zika como en el PRNT. Los resultados de LCR coincidieron con las pruebas de sueros pareados.

Evaluación de desempeño con infecciones del zika primarias y secundarias, estado de Yap, Micronesia, 2007

El CDC MAC-ELISA para Zika se incluyó en una serie de métodos inmunológicos de flavivirus, CDC MAC-ELISA y PRNT, para la evaluación de los especímenes de sueros pareados de 11 casos del virus del Zika identificados en el brote de Zika en el estado de Yap, Micronesia, en 2007 (Lanciotti, et al., 2008). En el momento de este brote, el MAC-ELISA para Zika utilizó antígeno de cerebro de ratón lactante extraído en acetona-sacarosa. Cuatro de los 11 casos son infecciones de flavivirus primarias, mientras que siete son posibles infecciones de flavivirus secundarias.

De los sueros pareados evaluados en la publicación, todos excepto un paciente tenían al menos un espécimen de suero dentro de nuestra ventana declarada de  $\geq 4$  días posteriores a la aparición de los síntomas y  $< 12$  semanas posteriores a la aparición de los síntomas. Incluimos en nuestro análisis el espécimen de suero más reciente de cada uno de los 10 casos restantes dentro de la ventana que declaramos.

Los resultados de MAC-ELISA para Zika de estos especímenes se comparan con sus resultados en la Prueba de Neutralización por Reducción de Placas (PRNT), la prueba estándar de referencia para los ensayos inmunológicos de flavivirus.

**Tabla 4: Resumen de los resultados de la PRNT de flavivirus y MAC-ELISA para Zika de los especímenes más recientes dentro de la ventana de infecciones del Zika primarias y secundarias en el estado de Yap, Micronesia, 2007**

	Caso	Especimen	Días posteriores a la aparición de los síntomas	Zika MAC-ELISA	PRNT (7 flavivirus)
<b>Infecciones primarias</b>	822	822a	5	23.2	Zika
	830	830b	21	16.3	Zika
	849	849b	18	18.2	Zika
	862	862a	6	25.4	Zika
<b>Infecciones secundarias probables</b>	817	817b	19	8.1	flavivirus
	833	833b	19	3.1	Zika
	844	844b	16	12.7	dengue
	955	955b	14	10.9	flavivirus
	968	Ningún espécimen dentro de la ventana declarada			
	839	839b	20	17.2	Zika
	847	847a	5	0.94	fiebre amarilla

		<b>Resultados de la PRNT (7 flavivirus)</b>			
		Zika	flavivirus	dengue	fiebre amarilla
<b>MAC-ELISA para Zika</b>	Positivo	6	2	1	0
	Negativo	0	0	0	1

Infecciones primarias:

Los 4 casos identificados como infecciones primarias dieron resultados positivos en el MAC-ELISA para Zika en su espécimen de suero inicial dentro de la ventana. Estos cuatro especímenes también dieron resultados positivos para la infección por el virus del Zika en la PRNT

Infecciones secundarias (probables):

De los seis casos con especímenes de suero dentro de la ventana, cinco dieron resultados positivos en los especímenes de suero más tempranos dentro de la ventana del MAC-ELISA para Zika. Dos de ellos (833b y 839b) dieron un resultado claramente positivo de la infección por el virus del Zika en la PRNT. Otros dos especímenes (817b y 955b) dieron resultados mayores en la PRNT del virus del Zika que de cualquier otro flavivirus probado. Sin embargo, estos resultados no fueron 4 veces superiores a todos los demás resultados, de manera que se interpretaron como un positivo en flavivirus en la PRNT. Los especímenes restantes dieron resultado positivo del MAC-ELISA para Zika y resultados 4 veces mayores en la PRNT de dengue que de Zika, el único espécimen en el que la PRNT no coincidió con la del MAC-ELISA para el Zika.

El espécimen 847a, tomado el día 5, dio negativo del MAC-ELISA Zika y dio positivo del virus de la fiebre amarilla en la PRNT. No se observó ningún efecto de neutralización del Zika en la PRNT. Así, coinciden los resultados de este espécimen en MAC-ELISA y PRNT.

## Contacto

Puede dirigir sus preguntas o comentarios acerca de este procedimiento al servicio de Red de Respuesta de Laboratorio (LRN, por sus siglas en inglés): [LRN@cdc.gov](mailto:LRN@cdc.gov).

## Referencias

Johnson, AJ, Martin, DA, Karabatsos, N y Roehrig, JT. *Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay*. J. Clinical Microbiology, 38:1827-1831, 2000.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, y Winn Jr. WC , (Eds). *Diagnosis of Infections caused by Viruses, Chlamydia, Rickettsia*, Diagnostic Microbiology, 4ª edición, JB Lippicott Co: 956-1074, 1992.

Lanciotti, RS, O.L. Kosoy, J.J. Laven, J.O. Velez, A.J. Lambert, A.J. Johnson, S.M. Stanfield, y M.R. Duffy. *Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007*. Emerg Infect Dis. 2008 (ago.); 14(8): 1232-1239.

Monath, TP, Nystrom, RR, Bailey, RE, Calisher, CH, y Muth, DJ:  
*Immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of St. Louis encephalitis*. Journal of Clinical Microbiology 20:784-790, 1984.

Martin, DA., Muth, DA., Brown, T., Karabatsos, N., and Roehrig, JT.  
*Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays (MAC-ELISA) for routine diagnosis of arboviral infections*. Journal of Clinical Microbiology 38:1823-1826, 2000.

Tsai, TH: *Arboviruses*, In Rose NR, Marcario EC, Fahey JL, Friedman H, y Penn GM, (Eds):  
Manual of Clinical Laboratory Immunology, 4th Edition, American Society for Microbiology: 606-618, 1976.